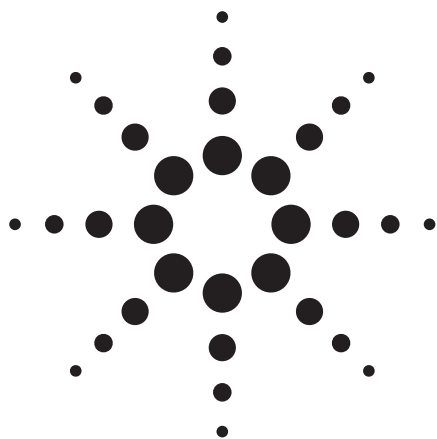




コリジョン/リアクションセル ICP-MS を 使用した血中および血清サンプル中の 18 元素同時定量

アプリケーション

医療

著者

R. Wahlen, L. Evans, J. Turner, and R. Hearn
LGC Limited, Queens Road
Teddington, Middlesex, TW11 0LY
UK

要旨

本研究では、Agilent Technologies の 7500ce コリジョン/リアクションセル ICP-MS システムを使用した、血中および血清中に含まれる 18 元素 (15 種類の微量元素と 3 種類の電解質成分) を定量するための堅牢なハイスループット分析メソッドの開発について説明します。必要なサンプル調製は、アンモニア、EDTA、Triton X-100、1-ブタノールを含むアルカリ性の希釈液によるサンプルの希釈だけです。装置のキャリブレーションは、内部標準を使用した絶対検量線法で行いました。本メソッドの性能は、少なくとも、サンプル処理数、精度下限および検出下限の 3 つの点において、前回使用した磁場型 HR-ICP-MS メソッドを上回る結果となりました。

はじめに

全血、血清、尿などの臨床試料に含まれる金属の分析は、毒性、作業環境、および栄養素の利用度などの情報を得るため、また、多くの病気の診断ツールとして長年に渡り利用されてきました。異なる臨床試料の種類に、多種多様な微量元素が可変的かつ低濃度 (ng/mL 以下) で現れるという事実は、臨床分析医に数々の難題を与えてきました。さらに、微量元素の分析に干渉する可能性のある有機化合物、

タンパク質、電解質塩などのマトリックス成分が高レベル (mg/mL 以上) で含まれることもよく起こります。また、分析するマトリックス、採取するサンプル量、およびサンプリング方法によっても制限されます。通常、十分な量の尿サンプルは、患者から非侵襲的な技術で採取することができますが、全血および血清の採取には、多くの場合、ニードルおよびシリンジを使用し、回収できるサンプル量は尿より少なくなります (通常は、 μL または mL 程度)。このため、採用する分析技術には次の能力が必要です。検出下限 (DL) が十分に低いこと、マトリックスに関連する干渉を克服できる能力、未知のサンプルの広範囲に渡る濃度を測定するための十分な直線性、多元素の同時定量、サンプル量の少なさに対処できる能力です。

検体マトリックスの誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) による分析は、広く普及してきています。その理由は、ICP-MS が上記の要件を多くの点で満たしているためです。具体的には、多くの微量元素に対する DL が低いこと (ng/mL 以下)、相対的に干渉の影響を受けないこと、多元素の同時定量が可能なこと、少量のサンプルの分析に適していること、さらに、同位体情報も得られること、高度なリファレンスキャリブレーション技術として同位体希釈法 (IDMS) を採用できる可能性があることが挙げられます。ICP-MS で分析した場合、多くの分析対象元素は、サンプルのマトリックスに由来するマススペクトルの干渉を受けます。十分に感度の高いコリジョン/リアクションセル (CRC) 四重極 ICP-MS 装置が開発される以前は、セクター型または高分解能 ICP-MS (HR-ICP-MS)¹、または原子蛍光法 (AF)² や原子吸光分析法 (AAS)³ などの質量分析技術を使用しない方法で、マトリックスによるスペクトル干渉の問題を解決しました。



Agilent Technologies

マトリックス効果を克服するもう 1 つの方法は、濃酸または灰化技術を使用して、サンプルを分解する方法です⁴。これらの技術は、高額な費用と時間を必要とし、数多くのサンプルを処理するには不適切である場合があります。

私たちの研究室では、磁場型 HR-ICP-MS (ThermoFinnigan 社製 Element 1) を使用して^{1,5}、メタルオンメタルによって腰関節置換を行った患者の手術前および手術後のサンプルをモニタリングしました。血液および血清サンプルは、約 0.7mM のアンモニア、0.01mM EDTA および 0.07% (v/v) の Triton X-100 で 1:20 に希釈し、尿サンプルは 1% HNO₃ で 1:15 に希釈した後、Al、V、Co、Cr、Mo、Ni および Ti などの元素を分析しました。この技術の一番の障害となった点は、特に費用でした。また、装置のセットアップ時間とダウンタイム、30 以上の血液または血清サンプルの分析を実行する間のマトリックスの耐性も問題となりました。

目的

本研究の目的は、CRC 四重極 ICP-MS (CRC-ICP-MS) をベースにし、シンプルな方法でサンプルを希釈した後、1 回の分析で幅広い種類の元素を測定できる、堅牢な ICP-MS 手法を開発することでした。

シンプルな方法によるサンプルの希釈を優れたサンプル前処理メソッドとして選びました。酸分解は、サンプルの前処理を含めた分析時間、費用、およびコンタミネーションの可能性を増加する場合があるためです。

バッチあたり最大 100 サンプルというサンプル処理数の要件を満たすために、定量メソッドは、外部キャリブレーションをベースにする必要がありました。このため、頻繁にリキャリブレーションおよびドリフト補正をしなくてもすむように、装置のドリフトを最小限に抑えることが重要でした。

目的元素は、微量金属 Al、As、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Mn、Mo、Ni、Pb、Sb、Se、V、Zn の他に、電解質 K、Mg および Na です。

目標とする感度は、私たちの研究室で HR-ICP-MS を使用して得られた前回の DL を満足するように、希釈していないサンプルで 0.2 ng/mL (たとえば、Co、Mo) および 1.0 ng/mL (Ni) としました。

サンプルの前処理

すべてのサンプル、標準物質および品質管理 (QC) 物質は、0.7 mM のアンモニア、0.01 mM の EDTA および 0.07%

(v/v) の Triton X-100 を含む溶液で 20 倍に希釈しました。1-ブタノールを炭素源として希釈液に 1.5% (v/v) で添加しました。これにより、標準物質とサンプルのマトリックスを一致させ、As および Se などの炭素含有量によってプラズマ内でのイオン化に影響を受ける目的元素の分析精度を上げることが目的です⁶。試料導入装置の化学的性質を分析をしている間一定に保つために、この希釈液を、分析前後のすすぎにも使用しました。HNO₃ のように、すすぎに広く使用されている酸を 1% の希釈レベルで使用しても、臨床マトリックス成分の凝固または沈殿を引き起こし、チューブまたはネブライザーが詰まる場合があります。

内部標準元素の選択と、内部標準の濃度は非常に重要です。通常、環境アプリケーションで使用される元素の多くが臨床試料に ng/mL レベルで存在するため、臨床分析では、元素の選択を制限されることがよくあります。最適な内部標準元素 (つまり、サンプル中に存在しないか、または極低レベルで存在する元素) を決定するために、血液および血清サンプルを半定量モードで分析しました。もともとサンプル中に Sc などの元素が存在するために、サンプル中の Sc の全 45Sc シグナルへの寄与が無視できるくらい小さくなるように内部標準元素の濃度を高めました。選択した内部標準元素 (Sc、Ge、Rh、In および Tl) は、20 ng/mL の濃度で希釈液に添加しました。このように内部標準を添加する際に、T-piece を介した内部標準元素のオンライン添加を使用する事で、混合時の問題を打ち消すことができました。

装置

Agilent 7500ce オクトポールリアクションシステム (ORS) ICP-MS を次の 3 つの異なるガスモードで使用しました。水素、ヘリウムおよび標準 (ガス無し) モードです。多元素を定量するための ICP-MS 条件および同位体、積算時間、ガスモードを表 1 および 2 に示します。すべての同位体は、スペクトルピークの中央の 3 点を使用して定量しました。

100 μ L/min の PFA マイクロフローネブライザを使用し、インテグレート試料導入装置 (内部標準) の大きいペリスタルポンプを使用することにより、サンプルの置換時間とリンス時間を短縮しました。試料導入装置およびマトリックス成分を含むプラズマの過負荷を抑えるために、分析および洗い出し中のポンプ速度は 0.1 rps に設定しました。内径 2.5 mm のインジェクタのトーチを用い、シールドトーチシステムを使用しました。また、ニッケル (Ni) 製のコーンを使用しました。

サンプルあたりの全分析時間は 208 s でした。この時間には、H₂、He、およびガス無しチューンファイルの取り込みと、ガスモードの切り替え時の 40 s の安定化時間が含まれています。各サンプル/標準溶液をすべてのガスモードで連続的に分析してから、オートサンブラのプロープが次のサンプルに移動します。各サンプルの分析後、オートサンブラのプロープを 5% HNO₃ で 5 秒間リンスし、次に、試料導入装置が希釈液で 30 秒間リンスしました。

表 1. 異なるガスモードで使用した ICP-MS パラメータ

	H ₂	He	標準
RF 出力 (W)	1500	1500	1500
キャリアガス (L/min)	0.87	0.87	0.87
メイクアップガス (L/min)	0.17	0.17	0.17
スプレーチャンバ温度 (°C)	2	2	2
ガス流量 (L/min)	4	4	不使用

表 2. 測定元素の分析パラメータ

測定元素	モニタした質量数 (m/z)	質量あたりの積分時間 (s)	使用した内部標準の質量数 (m/z)	使用したガスモード
Na	23	0.3	45	He
Mg	24	0.3	45	He
Al	27	3.0	45	He
K	39	0.3	45	He
V	51	1.5	45	He
Cr	53	3.0	45	He
Mn	55	0.9	45	ガス無し
Fe	56	0.3	45	H ₂
Co	59	1.5	45	He
Ni	60	1.5	45	He
Cu	65	0.9	72	He
Zn	66	0.3	72	He
As	75	1.5	72	He
Se	78	1.5	72	H ₂
Mo	95	1.5	103	ガス無し
Cd	111	1.5	115	ガス無し
Sb	121	0.9	115	ガス無し
Pb	206、207、 208の和	0.9	205	ガス無し

メソッドの性能と堅牢さ

提案した方法の安定性は、血液および血清サンプルを 10 時間にわたり連続的に実行すること (全部で 90 サンプル、キャリブレーション標準および QC チェックを含む)、および、内部標準元素の信号の挙動、検量線の勾配、検査標準をモニタリングすることによりテストしました。

装置の安定性—内部標準 元素のシグナル変動

選択した内部標準元素 (Sc、Ge、Rh、In、Ti) の代表的な信号の変動は、水素モードで 4.8%~9.3%、ヘリウムモードで 5.5%~8.2%、ガス無しモードで 6.7%~10.0% でした。これらの値は、血液および血清サンプルを 90 サンプル連続測定中に評価しました。図 1 は、10 時間測定中の内部標準元素の変動を示しています。Sc は、臨床試料の種類によっては ng/mL レベルで存在します。ここでは、サンプル 8 以降に確認できます。

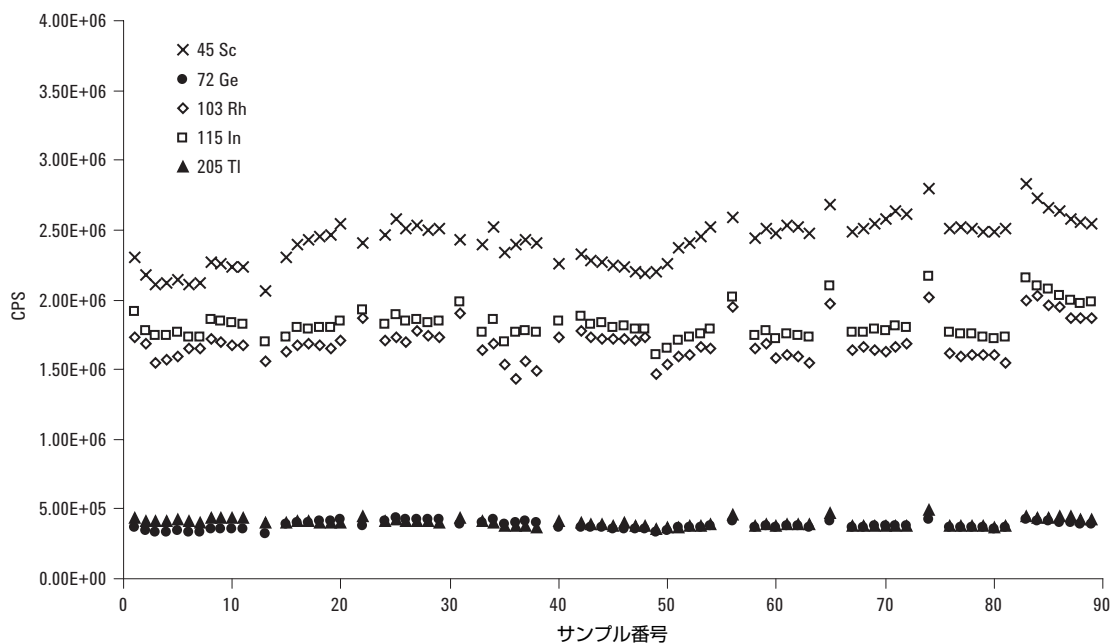


図 1. 10 時間測定における標準モードでの内部標準元素の信号の変動。

検量線の再現性と直線性

10 時間測定の最初、中間、最後に、それぞれ検量線を引き、検量線の堅牢さを評価しました。10 時間測定における V、Se、Pb の 3 つの検量線 (図 2) の勾配の相関係数は 0.9997 ~1.0000 で、これらのマトリックスを使用したメソッドの堅牢さが証明されました。測定されたすべての元素の相関係数は概ね $r^2 > 0.9900$ でした。

検査標準液

測定中、9 サンプルごとに 1 ng/mL レベルの微量元素を含む検査標準液を分析しました。検査標準液の分析結果は、テストした元素では、期待値に対して誤差 $\pm 10\%$ 以下でした。

試料導入装置上でのサンプルマトリックス効果

HR-ICP-MS を使用したこれらのマトリックスの分析に 20 倍未満の希釈率を使用すると、トーチインジェクタの詰まりなど、試料導入装置に頻繁に問題が発生します。四重極 ICP-MS を上記のように使用する場合、10 倍および 15 倍の希釈率を使用すると、試料導入装置 (図 3) や装置の性能に有害な影響を与えない場合があります。分析実行後に試薬ブランクを測定し、DL への悪影響や、バックグラウンドレベルに増加が見られないことを確認しました。

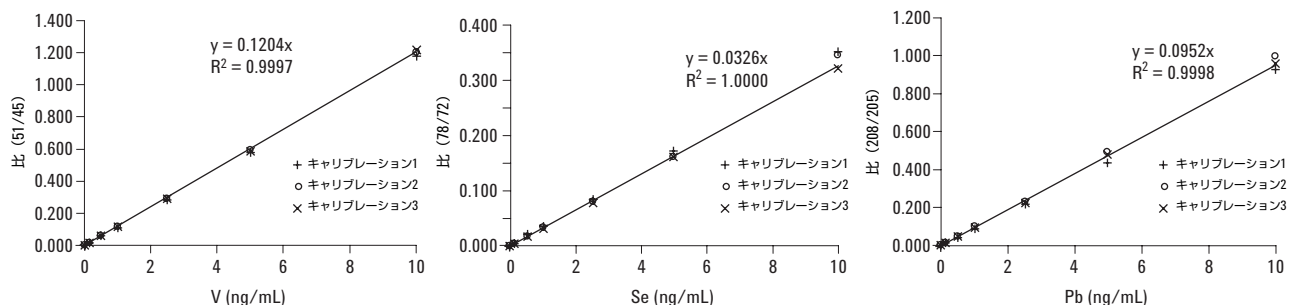


図 2. V、Se、Pb の検量線の直線性。90 サンプルの連続測定における外部検量線法の安定性を表す。

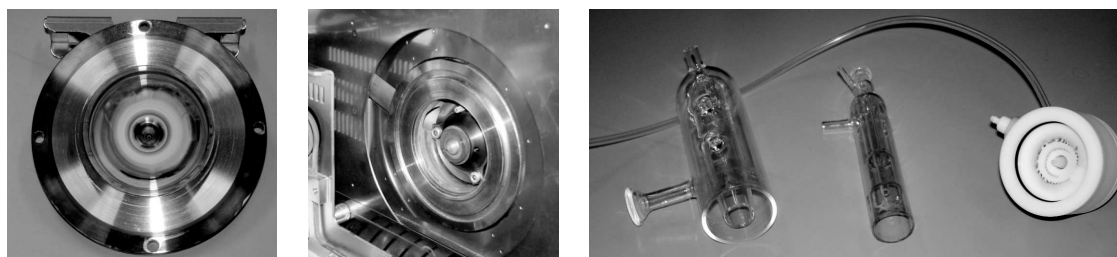


図 3. 90 サンプル測定後の、インターフェイスおよび試料導入装置の写真。サンプルおよびスキマーコーンにわずかなマトリックスの付着物が認められる。2.5 mm のインジェクターには、付着物がほとんどない。スプレーチャンバおよびネブライザーブロックの血液付着物は、次亜鉛素酸ナトリウム溶液にて除去。

標準試料 (CRM) の分析

標準試料 NIST SRM 1598 ウシ血清および標準試料 Seronorm MR9067 (ヒトの全血、レベル 2) から作成した複数のサブサンプル (n=4) を前述のとおり 20 倍に希釈し、表 1 および 2 に示した条件を用いて分析しました。これらの物質を選んだ理由は、異なる臨床マトリックスを代表し、濃度がサブ ng/mL レベルから mg/mL レベルに及ぶ幅広い測定対象元素が含まれているためです。同じ測定対象元素のレベルは、2 つの標準試料で大きく異なります。両試料の認証値および本研究でのメソッドの DL (希釈前のサンプルで計算し、ブランク測定値の標準偏差の 3 倍として算出) を表 3 に示します。

両試料の分析データは、認証値または参考値に対する回収率データとして、図 4a) および b) に示します。本研究用に選んだ標準試料の組み合わせでは、参考値しか利用できなかった Na を除く測定したすべての元素に対して、不確からしさの見積りと共に認証値が示されています。参考値に

対する Na の回収率は 99.0% でした。また、測定した残りの元素のデータは、片方の標準試料または両方の標準試料のいずれかの不確からしさの範囲内に入りました。認証値と一致しなかった元素 (たとえば、V、Cr、Cd) の場合、SRM 1598 の認証値はメソッドの DL 以下でした。Na、As、Ni、Pb は、SRM 1598 でのみ参考値として引用しました (表 3)。

表 3. SRM NIST 1598 および標準試料 Seronorm MR9067 に含まれる目的元素の認証値。比較のために、希釈前のサンプルに計算されたメソッドの DL を示す。

微量元素	NIST SRM 1598 ウシ血清 (ng/g)	Seronorm MR9067 ヒト血液、レベル2 (ng/mL)	DL (ng/mL)
Al	3.7±0.9	39–71	0.8
As	0.2*	10.6–11.8	0.1
Cd	0.089±0.016	4.8–6.0	0.1
Co	1.24±0.016	4.6–5.8	0.1
Cr	0.14±0.08	5.1–6.3	1.0
Cu	720±40	NA	0.4
Fe	2550±100	NA	19
Mn	3.78±0.32	10.1–13.3	0.1
Mo	11.5±1.1	5.3–6.7	0.1
Ni	0.7*	5.1–8.6	0.2
Pb	0.6*	373–417	0.1
Sb	NA	25–28	0.5
Se	42.4±3.5	114–130	0.2
V	0.06*	3.1–4.2	0.1
Zn	890±60	NA	3.0
主要元素	(μg/g)		(ng/mL)
K	196±5	NA	100
Mg	20.0±0.4	NA	1.5
Na	3000*	NA	5.0

*は参考値のみを表す

NA は不適用を表す

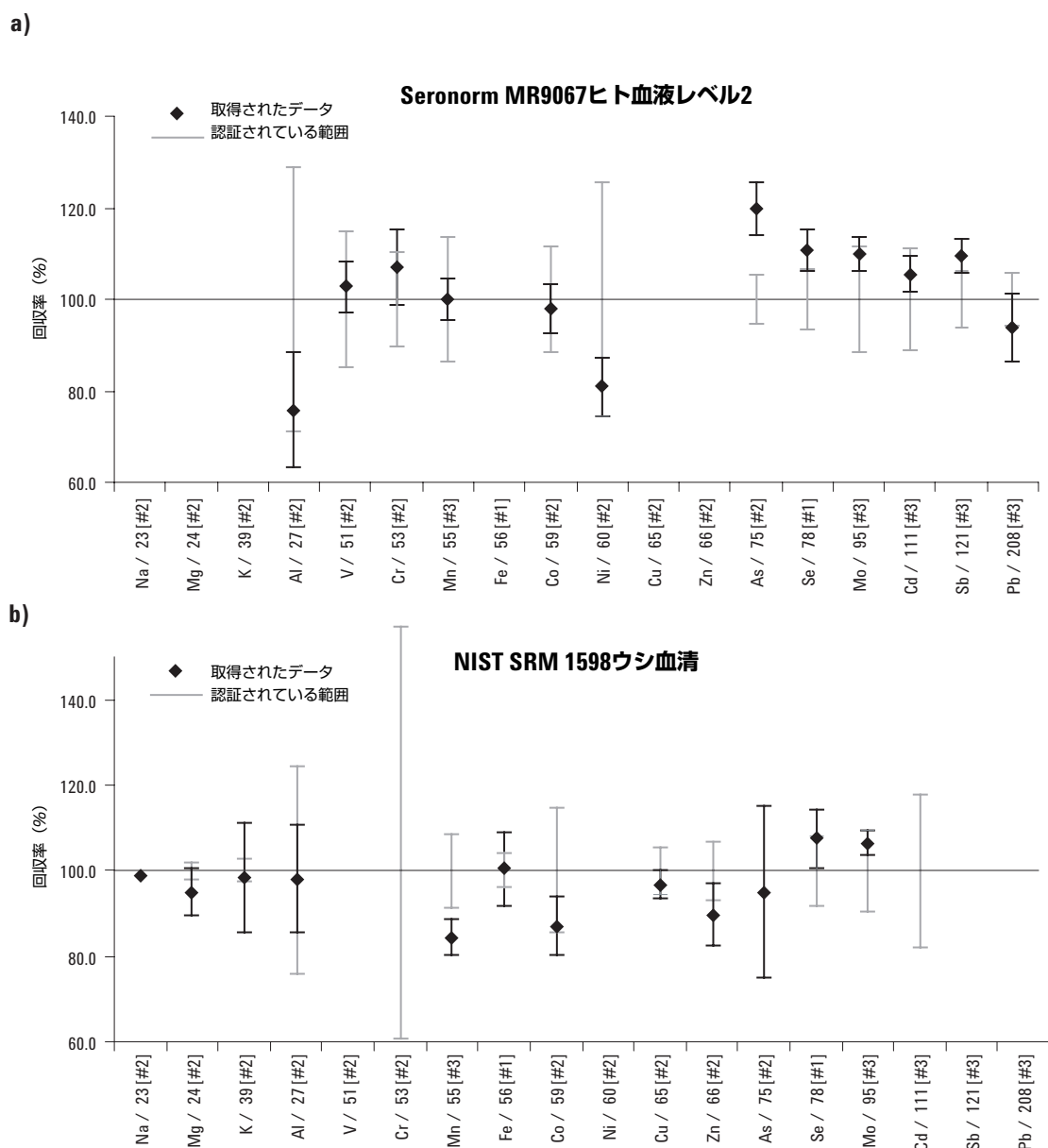


図 4. 取得されたデータを認証データに関連付けて表示したもの。a) ヒトの血液 Seronorm MR9067、b) ウシ血清 SRM NIST 1598。エラーバーは、取得されたデータの拡張した不確かさ、および標準試料の認証されている範囲を表す。同位体の後の番号は、使用されたチューンステップを示す（#1 = H2、#2 = He、#3 = ガス無し）。

マトリックスマッチングと内部標準元素選択の重要性

MR 9067 に含まれる As および Se のデータは、認証された平均値に比べるとやや高めになっています。これは、このマトリックスの炭素含有量が高めであることに由来する可能性があります。希釈液中の 1-ブタノールのレベルを 0% から 3% v/v へ高めると、これらの測定対象元素の回収率は減少し 100% に達します（図 5）。1-ブタノールを希釈液に添加しない場合、As および Se の回収率は、1-ブタ

ノールを 1.5% (v/v) 添加した場合に得られる回収率と比較して、平均認証値よりも大幅に高まります（それぞれ、94% および 72%）。両方の標準試料に含まれる As および Se に対して、標準添加法を使用することによって、両サンプルに対して完全なマトリックスを調整できました。Se の回収率はそれぞれ、NIST SRM 1598 で 95.8%、Seronorm MR9067 で 99.9%、また、As の回収率は Seronorm MR9067 で 102.6% でした。図 5 では、両方の元素に炭素を添加した効果が、わずかに異なることを示しています。

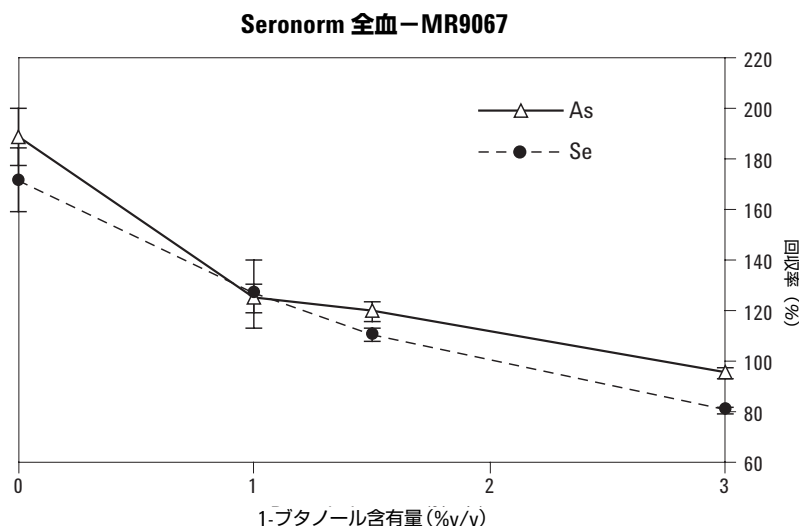


図 5. 希釈液に異なるレベルの 1-ブタノールを添加した場合の Serionorm 全血(レベル 2)に含まれる As および Se の回収率。

本研究で得られたデータによると、As の場合は 3% の添加が最適です(平均回収率 $95.4 \pm 2.3\%$)。一方、このサンプルに対する 1-ブタノールの理想的な添加量ほぼ 2% です。

プラズマ内でのマトリックス成分がイオン化に影響を与えるような元素の場合、精度を上げるために、マトリックスマッチングを十分に行う必要があります。それができない場合には(たとえば、異なるサンプルの炭素レベルが大きく変化するなど)、有機炭素マトリックスを破壊するために、密閉容器を使用したマイクロウェーブ分解などの別のサンプル前処理を使用する方が良い場合があります。ただし、サンプルの処理数が多い場合、サンプルの前処理を含めた分析時間が大幅に増加します。

すべての元素のスパイク回収率は $100 \pm 20\%$ 以内に入り、Fe、Se、Mo を除いた場合は、 $100 \pm 10\%$ 以内に入ります。Se の回収率が高いのは、炭素含有量のマトリックス調整が 1.5% の 1-ブタノールでのみ行われたことによると考えられます。HR-ICP-MS を使用してサンプルを分析した場合、Mo も高回収率が確認されました。この効果については、現在さらに調査中です。

スパイク回収率データ

両物質の測定対象元素である微量金属に対して、2～4 の異なるレベルで添加回収実験を行いました。濃度には、オリジナルの目的元素濃度の 2～5 倍の範囲を使用しました。この添加回収実験における唯一の例外は MR9067 の Fe でした。分析前に認証値または参考値が利用できなかったこと、そして、添加したスパイク濃度 (20 ng/mL) が、定量されたサンプル濃度 ($400 \pm 5 \mu\text{g/mL}$) よりも十分に高くなく、有意義な回収率データを得られなかったことが理由です。分析対象微量金属ですべての添加回収率結果は、表 4 に示されています。

表 4. 両標準試料について得られた平均添加回収率の結果

	NIST SRM 1598 ウシ血清	Serionorm MR9067 ヒト血液 レベル2
100% $\pm 5\%$	Al, V, Cr, Mn, Cu, Zn, Cd, Sb, Pb	Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Cd
100% $\pm 10\%$	Co, Ni, As	Zn, As, Sb, Pb
100% $\pm 15\%$	Fe, Se	Se
100% $\pm 20\%$	Mo	Mo

結論

単純に希釈した、分析の困難な臨床マトリックスに含まれる多元素を分析するための、高いサンプル処理能力(バッチあたり最高 100 サンプル)を持つ堅牢な CRC-ICP-MS メソッドを開発しました。メソッドの堅牢さは、10 時間の連続分析においてシグナルのドリフトが最小限に抑えられ、頻繁にリキャリブレーションをする必要がなかったことで証明されました。本メソッドの DL は、前回使用した HR-ICP-MS メソッドの DL に匹敵します。試料導入装置が堅牢であるため、臨床マトリックスの希釈レベルを下げることで、さらに DL を改善することも可能です。ng/mL ~ mg/mL の濃度レベルに渡り認証データが利用できた場合は、両標準試料に含まれるすべてのターゲット元素が、認証値の不確かさ内に入りました。すべての元素の添加回収率は $100 \pm 20\%$ 以内に入り、Fe、Se、Mo を除いた場合は、 $100 \pm 10\%$ 以内に入りました。

謝辞

本研究は、英国通商産業省 (Department of Trade and Industry, UK) より National Measurement System Valid Analytical Measurement (VAM) プログラムの一環として、サポートしていただきました。

Agilent Technologies には、本研究のために、7500 ICP-MS を ce レンズシステムにアップグレードしていただきました。ここに深く感謝いたします。

参考文献

1. C.P. Case, L. Ellis, J.C. Turner, and B. Fairman (2001) *Clinical Chemistry*, 47, 2, 275-280.
2. J.A. Holcombe and T.M. Rettberg (1986) *Anal.Chem.*, 58, 124R.
3. A. Taylor, and P. Green (1988) *JAAS*, 3, 115-118.
4. L. Dunemann (1991) *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, 39,10, M3.
5. D. Ladon, A. Doherty, R. Newson, J. Turner, M. Bhamra, and C.P. Case (2004) *The Journal of Arthroplasty*, 19, 8, 78-83.
6. E.H. Larsen, and S. Sturup (1994) *JAAS*, 9, 1099-1105.

さらに詳しくは...

当社の製品およびサービスの詳細についてはウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

お問い合わせは : 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

著者へのお問い合わせ : raimund.wahlen@lgc.co.uk

Agilent は、この文書に含まれる誤り、あるいは本資料の提供、履行、使用に関連して生じた付随的または間接的な損害について一切の責任を負いません。

本文書に記載の情報、説明、および仕様は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in the USA
June 10, 2005
5989-2885JAJP



Agilent Technologies